

***FILLER FOR CAPILLARY**

4

Publication number: JP5093709

Publication date: 1993-04-16

Inventor: AKASHI MITSURU; BABA YOSHINOBU; YASHIMA EIJI;
MIYAZAKI TAKESHI; MATSUMOTO TAKEO

Applicant: NIPPON OILS & FATS CO LTD

Classification:

- International: G01N27/447; G01N27/447; (IPC1-7): G01N27/447

- European:

Application number: JP19910278886 19911001

Priority number(s): JP19910278886 19911001

Report a data error here

Abstract of JP5093709

PURPOSE: To make selective separation based on the nucleic acid base composition of a sample compound.
CONSTITUTION: This filler for capillary is composed of polyacryl amide-based gel containing the polymer of 9-vinyladenine. This filler is a new filler for capillary which is useful for the separation, purification, and qualitative and quantitative analyses of various natural or nonnatural compounds containing nucleic acid bases at the time of performing the capillary electrophoresis(CE) method.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-93709

(43)公開日 平成5年(1993)4月16日

(51)Int.Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

FI

技術表示箇所

G 0 1 N 27/447

7235-2J

G 0 1 N 27/ 26

3 1 5 F

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21)出願番号

特願平3-278886

(22)出願日

平成3年(1991)10月1日

(71)出願人 000004341

日本油脂株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目10番1号

(72)発明者 明石 満

鹿児島県鹿児島市山田町2540-83

(72)発明者 馬場 嘉信

兵庫県神戸市垂水区本多間1-1-18第2

柏木ハイツ402号

(72)発明者 八島 栄次

愛知県名古屋市中東区亀ノ井2-38名大猪

高宿舍409

(74)代理人 弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キャピラリー用充填剤

(57)【要約】

【構成】 9-ビニルアデニンのポリマーを含むポリアクリルアミド系ゲルからなるキャピラリー用充填剤であり、キャピラリー電気泳動法(CE)において、核酸塩基を含む種々の天然あるいは非天然の化合物の分離、精製、定性、定量に有用な新規なキャピラリー用充填剤を提供する。

【効果】 従来のキャピラリー電気泳動法では不可能であった、試料化合物中の核酸塩基組成に基づく選択的分離が可能となった。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 9-ビニルアデニンのポリマーを含むポリアクリルアミド系ゲルからなるキャピラリー用充填剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、キャピラリー電気泳動法に用いられる新規なキャピラリー用充填剤に関し、主に核酸塩基を含む種々の天然あるいは非天然の化合物の分離、精製、定性、定量に有用な分析手段を提供するものである。

【0002】

【従来の技術】近年、タンパク質、オリゴペプチド、DNA、RNA、およびこれらのフラグメントの検出、定量、精製等において、従来の逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に代わるものとして、キャピラリー電気泳動法（CE）が注目され始めている。

【0003】キャピラリー電気泳動法は、

- ・試料量がナノリッターと極微量で済む、
 - ・検出感度がピコグラムレベルと高質量感度である、
 - ・電場にキャピラリーを用いるので泳動中に発生するジュール熱の放熱が速やかであり、よって分解能がきわめて高い、
 - ・分析時間が短い、
 - ・逆相高速液体クロマトグラフィーと同様なデータ処理が可能である、
 - ・操作が簡便である、
 - ・比較的低分子量のものから数万の高分子量の試料まで測定が可能である、
- などの非常に多くの利点を有する分析法である。

【0004】また使用されるキャピラリーおよび充填物の種類によって、キャピラリーゾーン電気泳動法、キャピラリー等速電気泳動法、キャピラリー等電点電気泳動法、キャピラリーゲル電気泳動法等、種々の手法が知られている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】従来のキャピラリー電気泳動法は、キャピラリーとして熔融シリカ、あるいはその内部にポリアクリルアミドゲルを充填したもの等を用いていた。しかし、これらは、試料物質中の電荷あるいは分子量の違いに基づいてのみ泳動、分離するものであり、これらの分離原理に加えて、さらに、試料中の核酸塩基組成に対し特異的な分離能を有するキャピラリー用充填剤は知られていない。

【0006】従って本発明の目的は、キャピラリー電気泳動法において試料中の核酸塩基組成に特異的な分離能を有するキャピラリー用充填剤を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明は、9-ビニルアデニンのポリマーを含むポリアクリルアミド系ゲルから

なるキャピラリー用充填剤である。以下、本発明をより詳細に説明する。本発明で用いられる9-ビニルアデニンのポリマーとは、9-ビニルアデニンの単独重合体および他の共重合可能なモノマーとの共重合体である。ここで他の共重合可能なモノマーとしては、特に限定されないが、好ましくは、その単独重合体が水溶性のもの、例えば、アクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-アクリロイルモルホリン、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、N-ビニルピロリドン、アクリル酸、メタクリル酸、無水マレイン酸、イタコン酸等およびこれらの混合物等があげられる。

【0008】これらのポリマーの合成は、ラジカル重合、イオン重合等の一般的な重合法により容易に行うことができる。例えば、水、ジオキサンなどの溶媒中、過硫酸アンモニウム、過酸化ベンゾイル等の重合開始剤の存在下、脱気条件下、あるいは不活性ガス雰囲気下で過熱、重合させ、さらに必要に応じて再沈殿、透析、ゲル濾過等の精製を行うことにより収率良く得ることができる。なお、この際のポリマー中の9-ビニルアデニンの組成比は、十分な性能を発現させるために、30重量%以上であることが好ましい。また分子量は特に限定されないが、十分な性能を発現させるために、300以上が好ましい。

【0009】また、9-ビニルアデニンのポリマーを含むポリアクリルアミド系ゲルを充填したキャピラリーの調製は、適当な緩衝溶液、例えばトリス-ほう酸-尿素中に、アクリルアミドおよびN,N-メチレンビスアクリルアミドおよび上述の9-ビニルアデニンのポリマーを同時に溶解させた後に、キャピラリー中に注入し、さらに重合させることにより行うことができる。この際用いられる重合開始剤としては、水溶性のものが好ましく、特に、過硫酸アンモニウムとN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン等のアミン類とによるレッドックス重合開始剤系が好ましい。また重合用調製液中の9-ビニルアデニンポリマーの量は0.001~10重量%が好ましい。重合反応は必要に応じて減圧下脱気あるいは不活性ガスで置換することが好ましく、また重合温度は、0~120℃、好ましくは20~60℃で、30分~48時間行うことが好ましい。

【0010】また、この際使用されるキャピラリーは、キャピラリー電気泳動に適合する素材であればよく、特に限定はされないが、簡便には、市販のヒューズドシリカ製の内径40~200μmのものが使用される。また、キャピラリーの有効長は特に限定されないが、好ましくは1cm~100cmである。1cm未満では十分な分離能が得られず、また100cmを超えると泳動時間が長くなり過ぎるため好ましくない。

【0011】

【発明の効果】本発明に特定したキャピラリー用充填剤

を用いることにより、従来キャピラリー電気泳動法ではなしえなかった試料化合物中の核酸塩基組成に基づく選択的分離が可能となり、従って、核酸塩基を含む種々の天然あるいは非天然の化合物のキャピラリー電気泳動法による分離、精製、定性、定量が可能となった。

【0012】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

調製例1 ポリ(9-ビニルアデニン)の合成

3つ口フラスコ中に9-ビニルアデニン20g、蒸留水100g、および過硫酸アンモニウム0.5gを入れ、窒素気流下、室温で30分間攪拌した後、60℃で3時間、さらに80℃で3時間攪拌した。これを、メタノール中に再沈澱することにより、白色粉末状、 $M_w=1200$ 、 $M_w/M_n=2.3$ (GPC法、スチレン換算による)のポリ(9-ビニルアデニン)を得た(収率55%)。なお、得られたポリ(9-ビニルアデニン)は良好な水溶性を有していた。

【0013】実施例1

0.1 M トリス-ほう酸尿素/7 M 尿素緩衝液(pH=8.6)を用い、前記調製例で得られたポリ(9-ビニルアデニン)を0.03重量%含む、8重量%アクリルアミド/5重量%N,N'-メチレンビスアクリルアミド(和光純薬(株)製、電気泳動法用試薬)溶液10gを調製した。これを減圧下脱気後、氷冷下にて、10重量%の過硫酸アンモニウム水溶液0.2gおよび10重量%のN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン水溶液0.2gを加え、よく攪拌した。一方、市販の電気泳動法用キャピラリー(ジエールサイエンス(株)製、内径100 μ m、非コートヒューズドシリカ)の内部を純水で10分間洗浄したのち、上述のアクリルアミド溶液で充分置換した。これを室温で30分間、さらに37℃で2時間静置し、重合を完結させ、ポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを調製した。

【0014】実施例2

実施例1と同様にして、0.1重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを調製した。

実施例3

実施例1と同様にして、0.2重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを調製した。

【0015】実施例4

実施例1および実施例3で調製した0.03重量%および0.2重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを緩衝液で充分リンスした後、これらを用いて(a)ポリデオキシアデニル酸の12~18量体および(b)ポリデオキシチミジル酸の12~18量体のキャピラリー電気泳動を測定した。その泳

動パターンを図1、図2に示す。

【0016】なお、測定は、下記の条件で行った。

キャピラリー：実施例1および3で調製したもの。有効長22cm

電圧：214 V/cm

カラム温度：30℃

緩衝液：0.1 M トリス-ほう酸/7 M 尿素 緩衝液(pH8.6)

試料注入：5 KV、1秒

検出：UV 260nm。

【0017】図1と図2を比較すると、0.03重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーの場合において、図2の泳動パターンの方がブロードである。これにより、僅か0.03重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を添加したことにより、ポリデオキシアデニル酸の12~18量体に比較して、ポリデオキシチミジル酸の12~18量体に対して、特異的な相互作用が生じていることがわかる。そして、図2より、0.2重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーでは、ポリデオキシチミジル酸の12~18量体が全く泳動されないことから、ポリデオキシアデニル酸の12~18量体のみの選択的な検出が可能となることがわかる。

【0018】比較例1

ポリ(9-ビニルアデニン)を含まず、それ以外は実施例1と同様にして調製したポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを用い、(a)ポリデオキシアデニル酸の12~18量体、(b)ポリデオキシチミジル酸の12~18量体、(c)ポリデオキシアデニル酸の12~18量体とポリデオキシチミジル酸の12~18量体の1:1の混合物のキャピラリー電気泳動を測定した。その泳動パターンを図3に示す。なお測定は、実施例4とまったく同様の条件で行った。

【0019】図3に見られるように、ポリ(9-ビニルアデニン)を含まないポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーでは、ポリデオキシアデニル酸の12~18量体とポリデオキシチミジル酸の12~18量体の分離は不可能であることがわかる。

【0020】実施例5

実施例2で調製した0.1重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを用い、ポリデオキシアデニル酸の12~18量体とポリデオキシチミジル酸の15量体の7:1の混合物のキャピラリー電気泳動を測定した。その泳動パターンを図4の(a)に示す。なお、測定は、カラム温度を50℃で4分間、その後、60℃に昇温し行なった。カラム温度以外は、実施例5と同様の条件で行った。

【0021】比較例2

ポリ(9-ビニルアデニン)を含まず、それ以外は実施例1と同様にして調製したポリアクリルアミド系ゲル充

填キャピラリーを用い、ポリデオキシアデニル酸の12～18量体とポリデオキシチミジル酸の15量体の混合物のキャピラリー電気泳動を測定した。その泳動パターンを図4の(b)に示す。

【0022】なお、測定は実施例5と同様の条件で行った。図4に示されるように、特に、ポリデオキシアデニル酸の12～18量体とポリデオキシチミジル酸の15量体との分離に注目してみると、ポリ(9-ビニルアデニン)を含まない比較例2のキャピラリーでは、ポリデオキシアデニル酸の17量体 $[p(dA)_{17}] \rightarrow$ ポリデオキシチミジル酸の15量体 $[p(dT)_{15}] \rightarrow$ ポリデオキシアデニル酸の18量体 $[p(dA)_{18}]$ の泳動順序である。これに対してポリ(9-ビニルアデニン)を含む実施例5のキャピラリーでは、0.1重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を添加することにより、 $[p(dA)_{17}] \rightarrow [p(dA)_{18}] \rightarrow [p(dT)_{15}]$ の順序となり、これによりポリデオキシチミジル酸の15量体の分離が、初めて可能となることが分かる。

【0023】以上の説明から明らかなようにキャピラリーゲル中のポリ(9-ビニルアデニン)濃度を適宜変えることにより、目的物の分離、定量を正確に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例4において0.03重量%および0.2重量

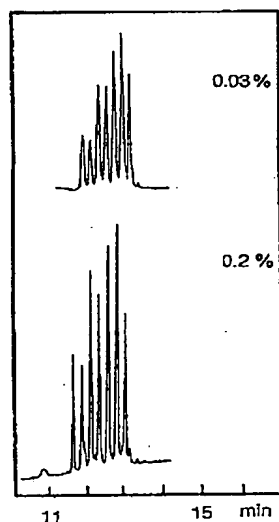
%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを用いたポリデオキシアデニル酸の12～18量体の電気泳動パターンである。

【図2】 実施例4において0.03重量%および0.2重量%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを用いたポリデオキシチミジル酸の12～18量体の電気泳動パターンである。

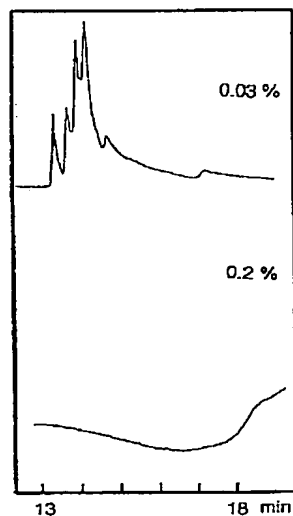
【図3】 比較例1において、ポリ(9-ビニルアデニン)を含まないポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを用いた(a)ポリデオキシアデニル酸の12～18量体 $[p(dA)_{12-18}]$ 、(b)ポリデオキシチミジル酸の12～18量体 $[p(dT)_{12-18}]$ 、(c)ポリデオキシアデニル酸の12～18量体 $[p(dA)_{12-18}]$ とポリデオキシチミジル酸の12～18量体 $[p(dT)_{12-18}]$ の混合物の電気泳動パターンである。

【図4】 (a)は実施例5の0.1%のポリ(9-ビニルアデニン)を含むポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリー、(b)は比較例2のポリ(9-ビニルアデニン)を含まないポリアクリルアミド系ゲル充填キャピラリーを、それぞれ用いた、ポリデオキシアデニル酸の12～18量体 $[p(dA)_{12-18}]$ とポリデオキシチミジル酸の15量体 $[p(dT)_{15}]$ との混合物の電気泳動パターンである。

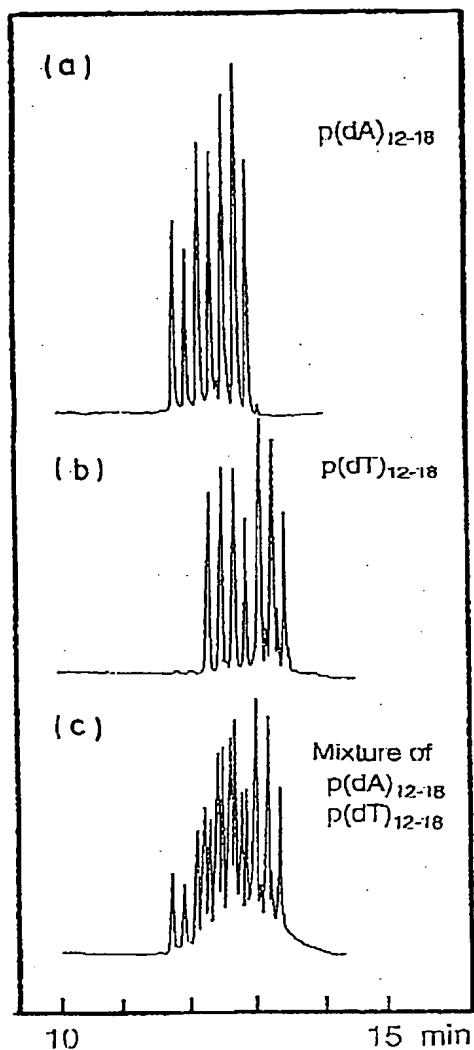
【図1】



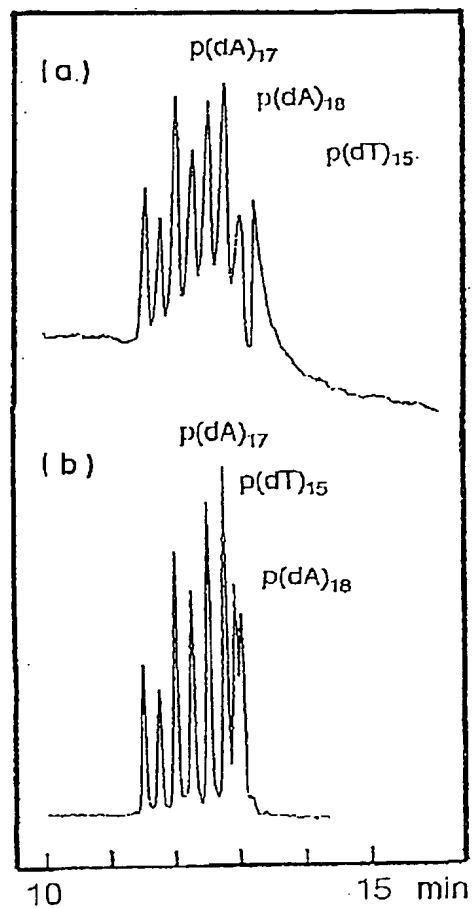
【図2】



【図 3】



【図 4】



フロントページの続き

(72)発明者 宮▲崎▼ 剛
茨城県つくば市春日2-17-1

(72)発明者 松本 竹男
茨城県つくば市東2-14-9